Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF,
Assoziation mit Euratom, München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE EINWIRKUNG VON THYMIDIN AUF KNOCHENMARKKULTUREN VON MENSCHEN IN VITRO

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Edgar Willenbrink
aus Rheine

1974

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF,
Assoziation mit Euratom, München
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

DIE EINWIRKUNG VON THYMIDIN AUF KNOCHENMARKKULTUREN VON MENSCHEN IN VITRO

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Edgar Willenbrink
aus Rheine

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. Hermann Michel

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 9. Dezember 1974

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Inhaltsverzeichnis

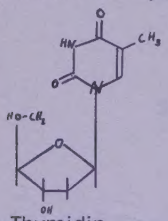
A. Einleitung und Fragestellung	2 - 5
B. Material und Methode	5 - 25
C. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	26- 34
D. Beurteilung der Ergebnisse und Diskussion	35- 38
E. Zusammenfassung	38
F. Literaturverzeichnis	39- 42
G. Lebenslauf	43

Einleitung und Fragestellung.

Für die Bearbeitung von zell- und molekularbiologischen Problemstellungen ist es häufig eine Vorbedingung, daß die Zellen einer proliferierenden Zellpopulation definierte Abschnitte des Zellzyklus synchron durchlaufen.

Viele Methoden sind beschrieben worden, um eine Synchronisation permanenter Zellstämme in Kulturen zu erreichen (5, 8, 12, 13, 17, 23, 24, 30, 32, 35).

Rueckert, Mueller und Littelfield hemmten die DNS-Synthese mit 5-Fluordeoxyuridine und fanden eine Wiederaufnahme der DNS-Synthese und Synchronisation der Zellteilung nach Zugabe von Thymidin. Xeros fand, daß durch Zugabe von Thymidin im Überschuß zu Zellkulturen ein hemmender und synchronisierender Effekt erzielt werden konnte.



Thymidin

A b b i l d u n g 1

Die DNS-Synthese wird unter anderem durch die Pyrimidinbasen kontrolliert (16, 27). Thymidin jedoch, das Nucleosid des Thymin, kommt selbst normalerweise nicht auf den Hauptstoffwechselwegen, die zur DNS-Synthese führen, vor, es kann aber leicht in das Stoffwechselgeschehen durch Phosphorylierung über TMP, TDP und TTP eingehen. Die an der Phosphorylierung beteiligten Enzyme sind als Thymidinkinase, Thymidinmonophosphatkinase und Thymidindiphosphatkinase bekannt. Obwohl Thymidin für die DNS-Synthese also nicht erforderlich ist, eine Ausnahme bilden Organismen, die nicht selbst TMP produzieren können, (Simon und Tessmann) so wird es doch in den meisten Organismen schnell in die DNS eingebaut (Cleaver). Die molekularen Mechanismen allerdings, welche der Hemmung der zellulären DNS-Synthese durch Thymidin, sowie seiner offenbar weitgehend auf die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus beschränkten cytotoxischen Wirkung zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt.

Nach Rajewsky, Fabricius und Hülser kommen folgende wahrscheinliche Angriffspunkte für Thymidin im Pyrimidinnucleotid-Stoffwechsel bei der DNS-Synthese in Frage.

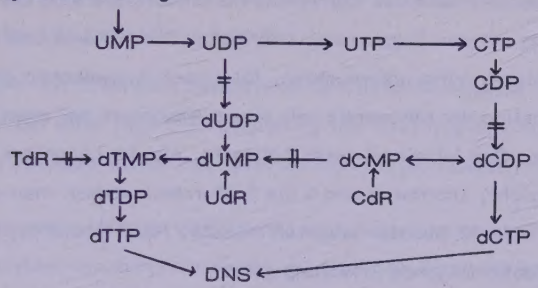


Abbildung 2

Schematische Darstellung des Pyrimidinnucleotid-Stoffwechsels bei der DNS-Synthese, sowie der wahrscheinliche Angriffspunkt von Thymidin im Überschuß (II).

CdR: Cytidin
dCMP: Desoxycytidinmonophophat
CDP: Cytidindiphosphat
dCDP: Desoxycytidindiphosphat
CTP: Cytidintriphosphat
dCTP: Desoxycytidintriphosphat

TdR: Thymidin
dTMP: Desoxythymidinmonophosphat
dTDP: Desoxythymidindiphosphat
dTTP: Desoxythymidintriphosphat

UdR: Uridin
UMP: Uridinmonophosphat
dUMP: Desoxyuridinmonophosphat
dUDP: Desoxyuridindiphosphat
UTP: Uridintriphosphat

DNS: Desoxyribonucleinsäure

Auch Morris, Reichard und Fischer fanden, daß Thymidin die DNS-Synthese hemmen kann. Dabei müßten sich die Zellen, die sich in der Post-DNS-Synthesephase (G_2), in der Mitosephase (M) oder in der praesynthetischen Phase (G_1) befinden, ganz normal durch diese Phasen des Zellzyklus bis zum Beginn der DNS-Synthesephase (S) entwickeln. Hier verharren sie, bis der Thymidinblock aufgehoben wird, um sich nach Durchlaufen der

S- und G_2-Phase zu teilen (Puck). Auch Bootsma, Budke und Voss fanden, daß eine Behandlung von Nierenzellen mit Thymidin im Überschuß einen Block während der S-Phase des Zellzyklus hervorruft. Sie sind damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Xeros. Nach Xeros und Bootsma, die Säugetierzellen in vitro untersuchten, folgt nach Auswaschen des Thymidin ein Anstieg der Mitoserate mit einem Maximum bei etwa 8 bis 10 Stunden. Das ist ein kürzerer Zeitraum, als der Länge der S- und G_2-Phase entspricht, (normal 8 und 3 bis 5 Stunden) wonach man das Maximum bei 11 bis 13 Stunden erwarten müsste. Nach Bootsma, Budke und Voss könnte es dafür folgende Erklärung geben:

1) Der Block liegt vielleicht nicht am Anfang sondern am Ende der S-Phase.
2) Die Blockierung ist nicht vollständig und die DNS-Synthese geht langsamer weiter.
3) Die Blockierung findet am Anfang der S-Phase statt, aber die S- und G_2-Phase verlaufen durch den Block langsamer bzw. schneller.

Da ausserdem schon in den ersten Stunden nach der Thymidinbehandlung Mitosen beobachtet wurden, wenn auch mit erniedrigtem Mitoseindex, konnte die Blockierung mit den gewählten Konzentrationen von 2 mM nicht vollständig gewesen sein.

Studzinsky und Lambert stellten später anhand ihrer Versuche an Hela-Zellen (32) fest, daß Thymidinkonzentrationen, (2-5 mM/l) wie sie gewöhnlich zur Synchronisation von Zellpopulationen gebraucht werden, die Proliferation nicht in der G_1-S-Grenze blockieren, jedoch eine langsamere Entwicklung der Zellen durch die Phase der DNS-Synthese bis zur G_2-Phase verursachen. Cleaver berichtet, daß eine Hemmung schon bei einer Thymidinkonzentration von 10^{-5}M und 10^{-4}M zu erkennen ist, diese aber erst bei einer Konzentration von 10^{-4}M deutlich wird. Eine Beeinträchtigung der RNS-und Proteinsynthese findet nicht statt, wenn Thymidin in der G_1-Phase zu synchronisierten Zellkulturen zugesetzt wird (Rao und Engelberg).

Klinische Untersuchung mit Thymidin hat Hausmann beschrieben.

Er erwähnt einen guten Therapieeffekt nach Anwendung von Thymidin bei 2 Patienten mit perniciöser Anaemie. Reisner und West erhielten eine leichte Retikulocytenvermehrung, aber keinen Effekt auf die Erythrocytenzahl in 3 Fällen von perniciöser Anaemie.

Oswald, Apple und Greenberg beschrieben die tumorhemmende Wirkung von Thymidin bei einer täglichen Dosierung von 5000 mg/kg Thymidin ip. beim Ehrlich Ascides-Tumor und beim soliden Ehrlich-Carcinom.

Da an Knochenmarkzellen in vitro bisher noch keine Untersuchungen mit Thymidin als einer synchronisierenden und die DNS-Synthese hemmenden Substanz vorlagen, ist es von Interesse, ob sich die experimentellen Befunde an Hela-Zellen unter anderem auch an diesem Material beobachten lassen. Ausserdem gehen die meisten Proliferationsuntersuchungen am Knochenmark von Versuchen mit markiertem Thymidin aus in der Annahme, daß der Thymidinzusatz per se die Proliferation nicht beeinträchtigt.

Wir verfolgten die Proliferation der Erythropoese und der Granulopoese bis 48 oder 72 Stunden Inkubation. Bei der Wahl der Thymidinkonzentrationen im Bebrütungsmedium stützten wir uns auf mehrere Autoren, welche, wie auch Bootsma, Thymidin im Überschuß (2-5 mM/l) zusetzten.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet:

Wird die Proliferation der Erythropoese und der Granulopoese durch Dosen von Thymidin, die Hela-Zellen unter anderem synchronisieren, beeinflusst?

Material: Große Knochenmarkbröckchen.
Benötigte Reagenzien: Thymidin in einer Konzentration von 6 mg/ml (24,7 mM/l) Versuchsansatz in Hank gelöst.

Methode: Das für unsere Versuche benötigte Material, wir verwendeten große Knochenmarkbröckchen, erhielten wir durch Sternalpunktion von insgesamt 5 Patienten. Ein kleiner Teil des

gewonnenen Materials wurde sofort am Krankenbett ausgestrichen. Fixiert und nach Pappenheim gefärbt, lieferten uns diese Originalpräparate neben dem für die Klinik wichtigen diagnostischen Ergebnis die Ausgangswerte zur Beurteilung der bei Bebrütung eintretenden Zellverschiebung. Das restliche Knochenmark wurde zur Verhinderung der Blutgerinnung in Heparinlösung (3mg% in Hank's-Lösung) gegeben, so schnell wie möglich ins Labor gebracht, und dort in einem durch UV-Bestrahlung keimarm gehaltenen Raum unter sterilen Bedingungen nach Carell und Boll kultiviert. Das Nährmedium enthielt bei den Kontrollen:

50% Eigenplasma der betreffenden Patienten,
10% Corhormon(R) der Chemiewerke Homburg
(3-fach verstärkt),
40% Hank's-Lösung.

Bei den Zusatzversuchen wurde zu den Knochenmarkbröckchen ausserdem Thymidin in einer Konzentration von 6mg/ml (24,7 mM/l) Versuchsansatz gegeben, das ganze in Zentrifugenröhrchen überführt und unter mehrfachem Schütteln bei 37°C 30 Minuten aufbewahrt. Danach wurde das Thymidin in Hank ausgewaschen, die Knochenmarkbröckchen auf den üblichen Koagulum Deckglaskulturen angesetzt und bei 37°C im Brutschrank eingelagert.

Jeweils nach 5 bzw. 6, 10 bzw. 12, 24 und 48 Stunden wurden Kontroll- und Versuchskulturen ausgestrichen und in gleicher Weise wie die Originalpräparate nach Pappenheim gefärbt. In einem Fall (Versuch I) wurde das Thymidin nicht nach 30 Minuten ausgewaschen, und die Kontroll- und Zusatzkulturen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden ausgestrichen.

Da die Zellen bei fortschreitender Bebrütung empfindlicher werden, genügte manchmal schon das Ausstreichen der Kulturen, um sie vollends zu einem undifferenzierbaren Zellbrei zu

zerdrücken. Es wurden daher pro Kultur und Bebrütungszeit mehrere Ausstriche angefertigt, um davon den besterhaltenen bei der Auszählung berücksichtigen zu können.

Bei der mikroskopischen Auszählung gingen wir mäanderförmig vor, wobei wir uns bemühten, möglichst viele Stellen mit aufgelockertem Zellgehalt zu berücksichtigen.

Ausgezählt wurden pro Präparat rund 2000 Zellen. Das Auszählergebnis umfaßt bei allen Fällen die rote Reihe, die weiße Reihe, Retikulumzellen, Plasmazellen, Megakaryocyten, Lymphocyten und Monocyten. Ausgewertet wurden nur die roten und weißen Reihen, die übrigen gezählten Zellen wurden nicht berücksichtigt. Innerhalb der Granulocytopoese und der Erythrocytopoese differenzierten wir unterschiedliche Zellklassen, die jeweils verschiedene Entwicklungsstufen von der Stammzelle bis zur reifen Zelle darstellen.

In der roten Reihe differenzierten wir 5 verschiedene Zellarten (4):

Proerythroblast	PR
basophiler Erythroblast	BE
polychromatischer Erythroblast	PE
oxyphiler Erythroblast	OE
reifer Erythroblast	RE

In der weißen Reihe sind unterschieden: (3)

Myeloblast	MB
Promyelocyt	PM
neutrophiler Myelocyt	MC
eosinophiler Myelocyt	EMC
basophiler Myelocyt	BMC
Metamyelocyt	MM
stabkerniger Granulocyt	St.G
segmentkerniger Granulocyt	Seg.G

Nach der Auszählung wurden in beiden Reihen die prozentualen Anteile der einzelnen Reifungsstufen an der Gesamtzahl der Erythrocytopoese bzw. der Granulocytopoese errechnet und das erhaltene Ergebnis in Reifungskurven (Abb. 3-7) und einer Mittelwertkurve (Abb. 8) zeichnerisch dargestellt, und zwar werden die gezählten Zellen eines Versuches auf der Abzisse additiv zu 100% aufgetragen. Die Ordinate ist in verschiedene Stundeneinheiten aufgeteilt und zeigt die Versuchsdauer an.

Besonderes Augenmerk wurde auf Mitosen gerichtet, da der Mitoseindex, die Zahl der beobachteten Mitosen berechnet auf 1000 teilungsfähige Zellen, ein wichtiges Merkmal für den Grad der Knochenmarkproliferation bildet. Bei der Erythrocytopoese (Tab. 1) betrachteten wir die Entwicklungsstadien bis zum OE als teilungsfähig, bei der weißen Reihe (Tab. 2) unterscheiden wir als teilungsfähige Zellen die Granuloblasten (MB, PM, MC) von den nicht mehr teilungsfähigen Granulocyten (MM, St.G, Seg.G).

Wir differenzierten folgende Teilungsphasen (3):

1.) Prophasen (P) — Kernmembran und Nucleoli sind nicht mehr vorhanden, die Kernsubstanz ist aufgelockert, das Spirem noch fest.

2.) frühe Metaphasen (fM) — Im jetzt lockeren Spirem sind die Chromosomen über die ganze Zelle verteilt.

3.) späte Metaphasen (sM) — Die Chromosomen sind zur Äquatorialplatte bzw. als Monaster angeordnet.

4.) Anaphasen (A) — In der meist ovalen Zelle haben die Chromosomen begonnen, zu den

beiden Spindelpolen auseinanderzuweichen und bilden einen Diaster.

5.) Telophasen (T) — Das Cytoplasma zeigt eine deutliche Taillenbildung, die nun getrennten Chromosomen liegen in beiden Zellhälften als lockeres Dispirem.

6.) Rekonstruktionsphasen (R) — Die beiden getrennten Zellen stehen manchmal noch über einen Plasmafaden in Verbindung. Kernmembran und Nucleolen fehlen in den 2 Kernen noch, die Chromosomen liegen im festen Dispirem.

Mitosezahlen, teilungsfähige Zellen und die aus diesen beiden Werten sich ergebenden Mitoseindices der 5 Versuche wurden in je einer Tabelle für Erythropoese (Tab. 1) und Granulopoese (Tab. 2) zusammengefasst.

Das Verhältnis der Gesamtzahlen beider Reihen bei jeweils rund 2000 gezählten Zellen pro Kultur und Zeit wurde im G/E Index rechnerisch erfasst (Tab. 3).

Ferner wurden Mittelwerte der Mitoseindices der roten und der weißen Reihe in einer Kurve dargestellt (Abb. 9).

Es wurde ebenfalls eine Mittelwertkurve der G/E Indices (Abb. 10) angefertigt.

Schließlich wurden die einzelnen Teilungsphasen aus den Summen der in den Originalausstrichen und den Ausstrichen der verschiedenen Kulturreihen beobachteten Mitosen aller 5 Versuche errechnet und diese in einer karyologischen Kurve der Erythropoese und der Granulopoese verdeutlicht (Abb. 11).

Ergebnisse

Es wurden insgesamt 90249 Zellen differenziert.

Versuch I: A., Marta, 80 Jahre

Klinische Diagnose: Colon-Carcinom

Labortechnische Untersuchung zur Zeit der Punktion (7.12.66):

Fe Serumspiegel 34 %

BSG 22/55

Gesamteiweiß 6,86 g %

Blutbild (2.12.66)

Erythrocyten	Ery	:	4,08 Mill/mm^3
Hämoglobin	Hb	:	7,5 g %
absoluter Hämoglobingehalt	Hb_E	:	18 pg
Haematokrit	HTK	:	34 %

Leukocyten	Leuko	:	7300/mm^3
Basophile Leukocyten	Bas	:	-
Eosinophile Leukocyten	Eos	:	2 %
Myeloblasten	MB	:	-
Promyelocyten	PM	:	-
Myelocyten	M	:	1 %
Metamyelocyten	MM	:	4 %
Stabkernige Granulocyten	St.G	:	8 %
Segmentkernige Granulocyten	Seg.G	:	63 %
Lymphocyten	Lym	:	18 %
Monocyten	Mono	:	4 %
Thrombocyten	Thrombo	:	229000/mm^3

Verabreichte Medikamente: Complamin^R

Sternalpunktat vom 7.12.68:

Angeregte Erythropoese wie bei Eisenmangel.

Nach der Granulopoese liegt ein entzündlicher Prozess vor.

Es wurden Kontrollkulturen und Zusatzkulturen nach 24, 48 und 72 Stunden angelegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 (Reifungskurven), Tab. 1 (rote Mitoseindices), Tab. 2 (weiße Mitoseindices) und Tab. 3 (G/E Indices) dargestellt.

Bei der Beurteilung der Erythropoese fällt auf, daß die Thymidin-Zusatzkurve bei 24 Stunden eine stärkere Ausreifung gegenüber den Kontrollkulturen aufweist. Ab 48 Stunden verlaufen die Zusatz- und Kontrollkulturen wieder parallel und normal.
Der rote Mitoseindex vom Thymidinzusatz ist auch bei 24 Stunden gegenüber den sehr niedrigen Kontrollen erhöht.

Für die Granulopoese ergibt sich:

Bis auf die Kontrollkulturkurve der Metamyelocyten, die bei 72 Stunden eine Linksverschiebung aufweist und bei 48 Stunden eine Rechtsverschiebung, verlaufen alle Kurven etwa parallel und im Bereich der Norm.

Auch hier zeigt der weiße Mitoseindex in den Zusatz- und Kontrollkulturen eine leicht abfallende Tendenz, wobei die Zahl der teilungsfähigen Zellen beim Zusatz allerdings vermehrt abgenommen hat im Vergleich zu den Kontrollkulturen.

Der G/E Index zeigt während der Bebrütung eine leicht fallende Tendenz.

Legende zu den Abbildungen und Tabellen

Abbildungen und Tabellen	teilf.Z.	Zahl der teilungsfähigen Zellen
	O	Originalausstrich
	K	Kontrollkulturen
	Z	Zusatzkulturen
	h	Zeit, gemessen in Stunden nach Beginn der Auswertung
Abzisse	PR	Proerythroblast
	BE	basophiler Erythroblast
	PE	polychromatischer Erythroblast
	OE	oxyphiler Erythroblast
	RE	reifer Erythroblast
	MB	Myeloblast
	PM	Promyelocyt
	MC	neutrophiler Myelocyt
	EMC	eosinophiler Myelocyt
	BMC	basophiler Myelocyt
	MM	Metamyelocyt = Jugendlicher M.
	St.G	Stabkerniger Granulocyt
	Seg.G	Segmentkerniger Granulocyt
	P	Prophase
	f.M	frühe Metaphase
	s.M	späte Metaphase
	A	Anaphase
	T	Telophase
	R	Rekonstruktionsphase
Ordinate	Mi ‰	Mitoseindex ‰ = Zahl der Mitosen, berechnet auf 1000 teilungsfähige Zellen
	r.Mi ‰	Mitoseindex ‰ der Erythropoese
	w.Mi ‰	Mitoseindex ‰ der Granulopoese
	G/E Index	Verhältnis der Gesamtzahlen der Granulopoese und Erythropoese

Versuch I

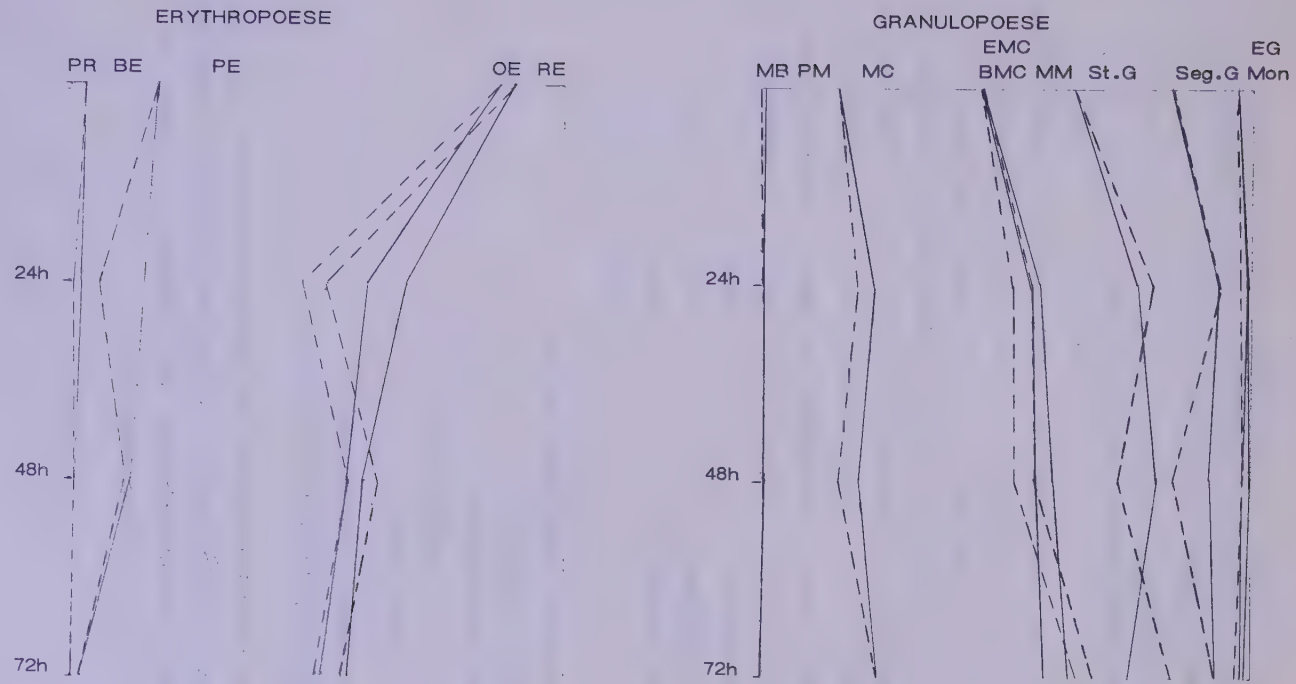


Abbildung 3

Versuch II: H., Alfred, 76 Jahre

Klinische Diagnose: Schlafmittelintoxikation, Aortenaneurysma.

Labortechnische Untersuchung vom 6.6.68:

BSG 83/122

Papierelektrophorese: Albumin 2,34 g %

α_1-Globulin	0,63 g %
α_2"	1,18 g %
β"	1,18 g %
γ"	1,63 g %
ges. Eiweiß	6,96 g %

Blutbild vom 25.5.68:

Ery	:	3,50 Mill/mm^3	Leuko	:	13200/mm^3
Hb	:	13,0 g %	Bas	:	2 %
Hb_E	:	37 pg	Eos	:	1 %
Anisocytose	:	+	St.G	:	3 %
Poikilocytose	:	+	Seg.G	:	74 %
tox. Granulation	:	+	Lym	:	15 %
			Mono	:	5 %

Verabreichte Medikamente pro die:

2 Tabl. Distraneurin^R

3 x 1 Dragee Tanderil^R

3 x 1 Tabl. Ca-Brause-Tabl.

2 x 1 Tabl. Lanicor^R

Sternalpunktat vom 6.6.68.

Angeregte Erythro- und Granulopoese.

Es wurden Kontrollkulturen und Zusatzkulturen nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden angelegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 (Reifungskurven), Tab. 1 (rote Mitoseindices), Tab. 2 (weiße Mitoseindices) und Tab. 3 (G/E Indices) dargestellt.

Bei der Erythropoese liegt eine verstärkte Ausreifung der Zusatzkulturen bei 24 und 48 Stunden vor. Der Kurvenverlauf ist sonst im Wesentlichen bis auf die 6. Stunden parallel. Die roten Mitoseindices der Kontroll- und Zusatzkulturen zeigen bis 24 Stunden eine steigende Tendenz mit einem Maximum nach Thymidinzusatz bei 12 Stunden.

Die Granulocytopoese zeigt einen normalen Kurvenverlauf der Kontrollkulturen mit Linksverschiebung der Zusatzkulturen nach 24 und 48 Stunden. Bei 72 Stunden liegt bei der Zusatzkultur, wie auch schon bei Versuch I, eine verminderte Ausreifung vor. Bei Thymidinzusatz ist der weiße Mitoseindex erhöht mit einem Maximum bei 12 Stunden.

Der G/E Index ist bei Thymidinzusatz bis 24 Stunden etwas erniedrigt und später etwas erhöht.

Versuch II

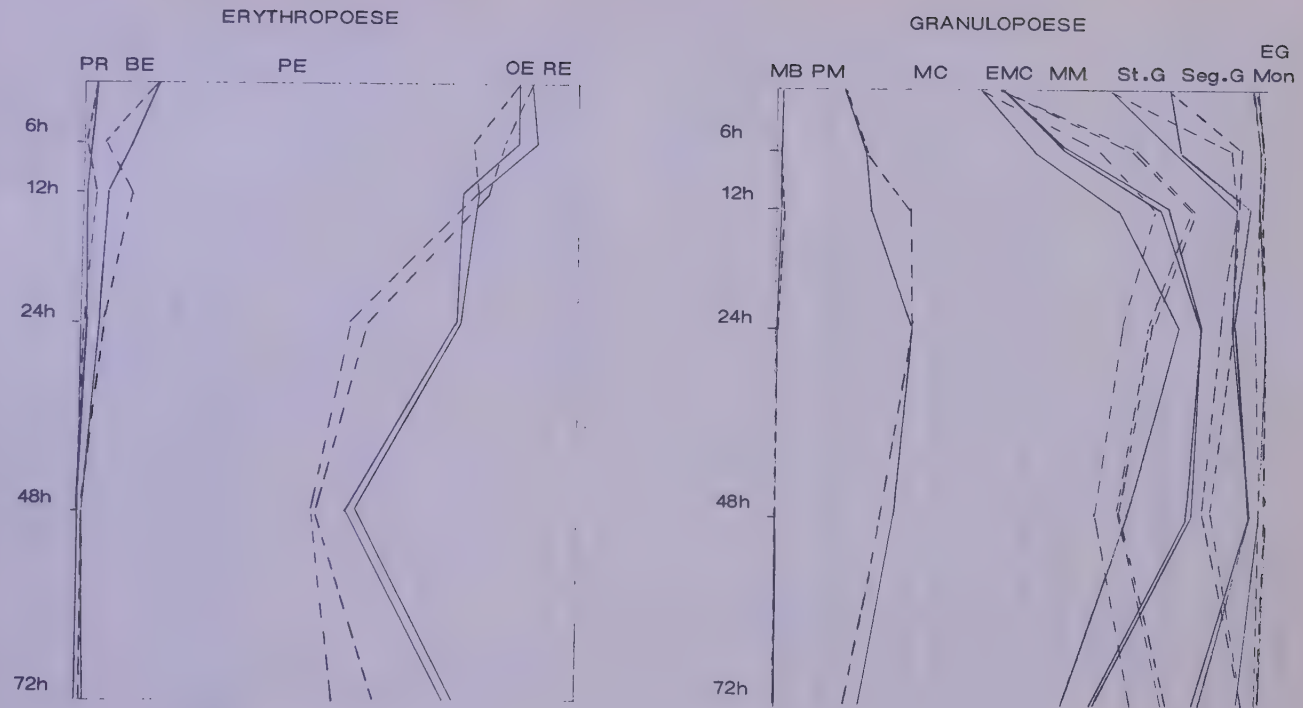


Abbildung 4

Versuch III: S., Berta, 68 Jahre

Klinische Diagnose: Metastasierendes Ovarialcarcinom.

Labortechnische Untersuchung vom 26.4.72.

BSG 89/108

Blutbild vom 26.4.72:

Ery	:	4,00 Mill/mm^3	Leuko	:	4900/mm^3
Hb	:	12,0 g %	Bas	:	1 %
Hb_E	:	30,0 pg	Eos	:	2 %
Aniso	:	+	St.G	:	4 %
			Seg. G	:	77 %
			Lym	:	9 %
			Mono	:	7 %
			Thrombo	:	165000/mm^3

Verabreichte Medikamente pro die:

2 x 1 Tabl. Lanicor^R

6 x 1 Dragee Aldactone^R

1 x 1 Tabl. Lasix^R

1 g Cebion^R

Sternalpunktat vom 2.5.72.

Reichlich Megakaryocyten, auch übersegmentierte. Sonst unauffälliges Knochenmark.

Es wurden Kontrollkulturen und Zusatzkulturen nach 5, 10, 24 und 48 Stunden angelegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 (Reifungskurven), Tab. 1 (rote Mitoseindices), Tab. 2 (weiße Mitoseindices) und Tab. 3 (G/E Indices) dargestellt.

Die Erythropoese zeigt durch den Thymidinzusatz eine vermehrte Ausreifung bis 24 Stunden, nach 48 Stunden eine verminderte. Der rote Mitoseindex der Zusatzkulturen ist bei 10 Stunden ebenfalls erhöht und liegt nach 48 Stunden unter den Werten der Kontrollen.

Die Granulopoese zeigt in den Zusatzkulturen wie beim II. Versuch bei 5 und 10 Stunden eine Reifungshemmung gegenüber den Kontrollen, aber ab 24 Stunden bleibt der Kurvenverlauf parallel. Der bei 10 Stunden erhöhte weiße Mitoseindex der Zusatzkulturen liegt bei 24 Stunden wieder unter den Werten der Kontrollen und zeigt bei 48 Stunden mit und ohne Zusatz praktisch denselben Wert.

Der G/E Index liegt bei Zusatz bis 24 Stunden unter dem der Kontrollkultur, dann darüber, wobei der Zusatz eine relative Vermehrung der Erythroblasten bei 5 Stunden bewirkt hat.

Versuch III

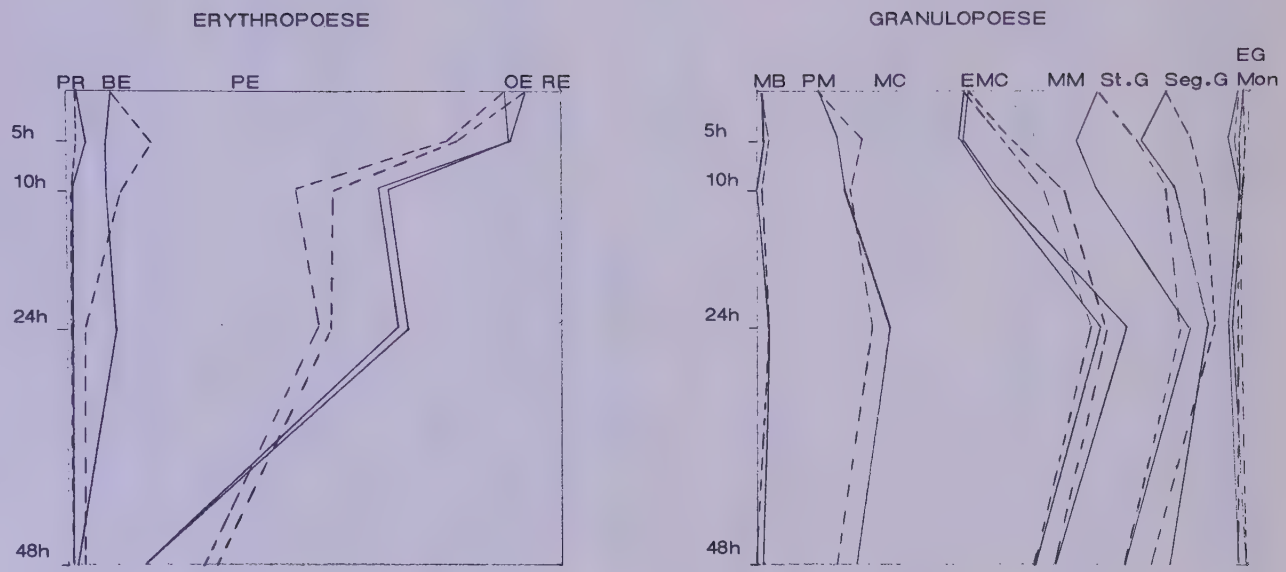


Abbildung 5

Versuch IV: S., Albert, 73 Jahre

Klinische Diagnose: Vorderwandinfarkt, chronische Pyelonephritis beiderseits.

Labortechnische Untersuchung vom 16.5.72.

BSG 125/133

Blutbild

Ery	:	2,93 Mill/mm^3	Leuko	:	5600/mm^3
Hb	:	9,3 g %	St.G	:	9 %
Hb_E	:	31,8 pg	Seg.G	:	31 %
Aniso	:	+	Lym	:	46 %
Poikilo	:	+	Mono	:	14 %
			Thrombo	:	160000/mm^3

Verabreichte Medikamente pro die: Lanicor^R (0,5 mg)

Sternalpunktat vom 16.5.72.

Die Granulopoese weist eine leichte Linksverschiebung und toxische Granulation auf. Normale Erythro- und Thrombopoese. Das Knochenmark spricht für einen entzündlichen Prozess.

Es wurden Kontrollkulturen und Zusatzkulturen nach 6, 10, 24 und 48 Stunden angelegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 (Reifungskurven), Tab. 1 (rote Mitoseindices), Tab. 2 (weiße Mitoseindices) und Tab. 3 (G/E Indices) dargestellt.

Bis auf eine geringe Linksverschiebung der Zusatzkurve der basophilen Erythroblasten bei 6 Stunden, die zufällig bedingt sein kann, verlaufen in der Erythropoese Kontroll- und Zusatzkurven bis 24 Stunden etwa parallel. Ab 48 Stunden zeichnet sich jedoch bei Thymidinzusatz eine Hemmung der Ausreifung ab.

Der rote Mitoseindex zeigt bei den Kontroll- und Zusatzkulturen eine ansteigende Tendenz, er erreicht beim Zusatz bei 10 Stunden ein Maximum, das sogar weit über der Norm liegt.

Bei der Granulopoese fällt eine Linksverschiebung der Kurven bis 10 Stunden nach Zusatz von Thymidin auf. Ab 24 Stunden zeigen die Kurven der Kontroll- und Zusatzkulturen jedoch wieder einen parallelen Verlauf.

Der zu Beginn der Kultur erhöhte weiße Mitoseindex blieb bis 24 Stunden etwa gleich hoch, um sich nach 48 Stunden in beiden Kulturen zu verringern.

Der stark erhöhte G/E Index fällt schon nach 6 Stunden ab und wird durch den Thymidinzusatz bis 48 Stunden kaum geändert.

Versuch IV

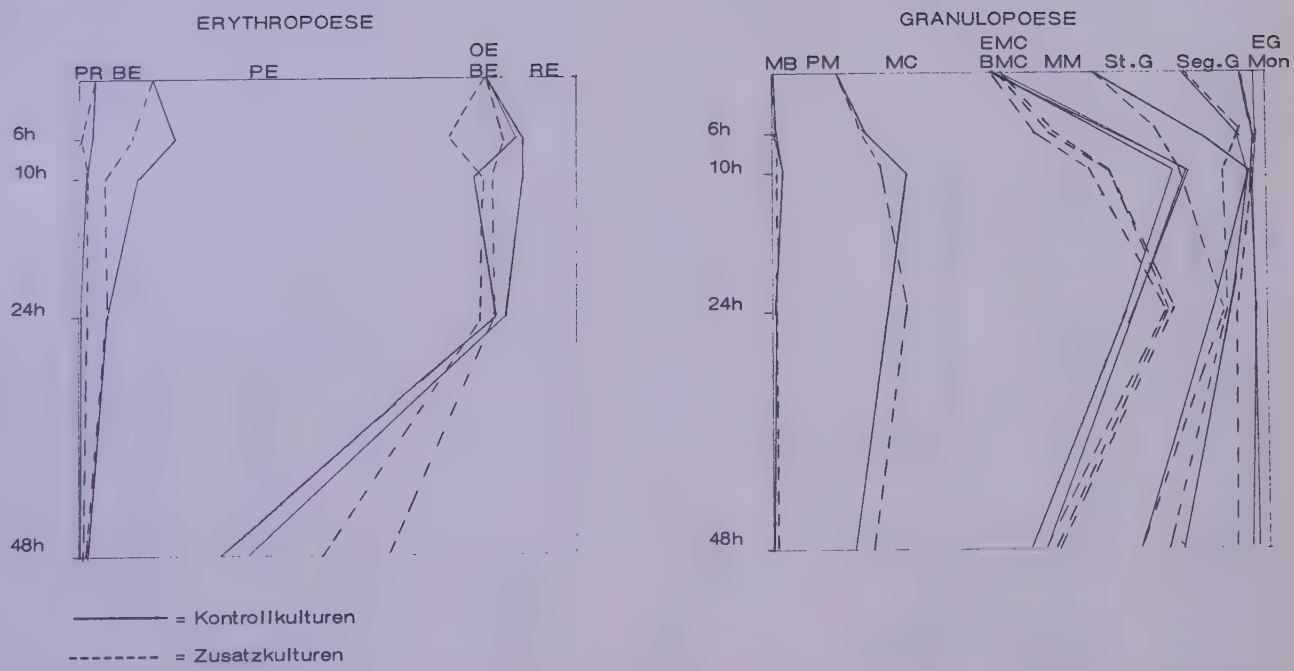


Abbildung 6

Versuch V: B., Gustav, 83 Jahre

Klinische Diagnose: Verdacht auf Erythroleukämie.

Labortechnische Untersuchung zur Zeit der Punktion.

Osmotische Resistenz: Beginn Haemolyse: 0,44% Na Cl

Kompl. Haemolyse: 0,20% Na Cl

Bilirubin: dir. 0,7 mg %

ges. 1,2 mg %

BSG 55/120

Blutbild vom 16.5.72

Ery	:	1,86 Mill/mm^3	Leuko	:	4100/mm^3
Hb	:	6,0g%	St.G	:	6 %
Hb_E	:	32,3 pg	Seg.G	:	49 %
Aniso	:	+	Lym	:	36 %
Poikilo	:	+	Mono	:	9 %
			Thrombo	:	209000/mm^3

Sternalpunktat vom 16.5.72

Die Erythropoese ist stark links verschoben und hat einen erhöhten roten Mitoseindex. Bei den reiferen Formen kommt eine basophile Tüpfelung vor. Atypische, übergroße Proerythroblasten und Megaloblasten kommen reichlich vor.
Es könnte sich um eine haemolytische Krise handeln.

Es wurden Kontrollkulturen und Zusatzkulturen nach 6, 10, 24 und 48 Stunden angelegt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 (Reifungskurven), Tab. 1 (rote Mitoseindices), Tab. 2 (weiße Mitoseindices) und Tab. 3 (G/E Indices) dargestellt.

Bei der Erythropoese fällt eine verminderte Ausreifung nach Zusatz von Thymidin bei 6 und 10 Stunden auf, wohingegen ab 24 Stunden der Kurvenverlauf unauffällig und parallel ist. Der auf 49 ‰erhöhte rote Mitoseindex fällt auf 24 ‰nach 10 Stunden und steigt bei den Kontrollkulturen ab 24 Stunden wieder leicht auf 30 ‰an. Nach Thymidinzusatz erreicht

er bei 10 Stunden wieder ein Maximum (43 ‰).

Die Granulopoese zeigt bei den Zusatzkulturen eine fehlende Vermehrung teilungsfähiger Zellen nach 10 bis 24 Stunden. Bei 48 Stunden läßt die Deutung der Zusatzkurven eine Hemmung der Ausreifung zu.

Der weiße Mitoseindex nach Thymidinzusatz ist im Vergleich zu den Kontrollkulturen bei 10 und 48 Stunden etwas erhöht.

Der G/E Index zeigt sowohl für die Zusatzkulturen als auch für die Kontrollkulturen eine Vermehrung von Erythroblasten bis 24 Stunden an, da er bis 24 Stunden abfällt.

Versuch V

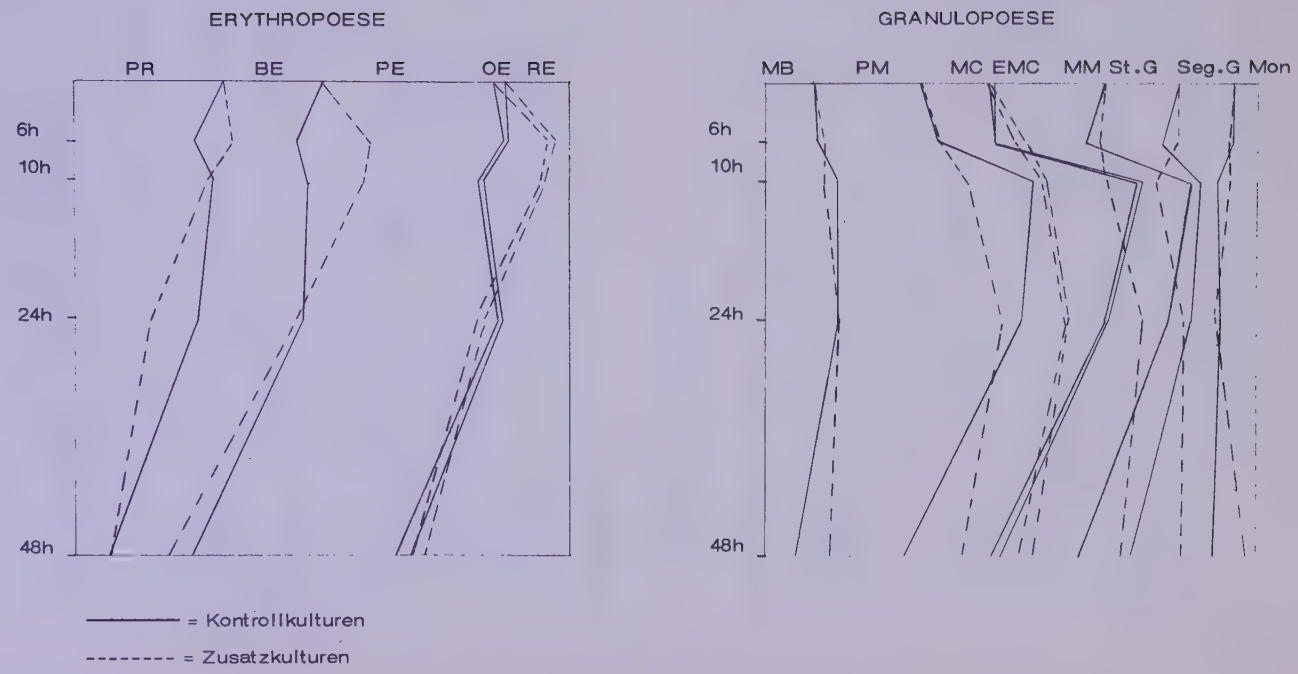


Abbildung 7

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Bei der Betrachtung der einzelnen Reifungskurven aller Versuche (Abb. 3-7) sind teilweise Abweichungen des Verlaufes der Kontrollen und der Zusatzversuche festzustellen. Für die Abweichungen könnten die unterschiedlichen Grundkrankheiten der Knochenmarkspender, die Reaktion der Zellen auf den Entnahmeschock sowie Einflüsse während der Kultivierungsperiode verantwortlich gemacht werden. Deshalb ist auf eine eingehende Beurteilung der Einzelversuche verzichtet worden, und statt dessen sollen nach Errechnung des arithmetischen Mittels für die Zusatzversuche und deren Kontrollen die durchschnittliche Reifungskurve (Abb. 8), die Mittelwertkurve der Mitoseindices (Abb. 9), die Mittelwertkurve der G/E Indices (Abb. 10) und die karyologische Kurve (Abb. 11) beschrieben werden.

Folgendes konnte beobachtet werden:

Erythropoese:

Die Reifungskurve der Mittelwerte der Erythropoese (Abb. 8) zeigt bis 10 Stunden ein etwa gleiches Verhalten der Reifungsstufen, zwischen 10 und 24 Stunden jedoch für die Zusatzkultur eine auffällige Zunahme der reifen Erythroblasten zu ungunsten der polychromatischen Erythroblasten gegenüber den zugehörigen Kontrollkulturen an. Bei 48 Stunden ist hingegen der umgekehrte Effekt zu erkennen.

Die Wirkung einer Zugabe von Thymidin im Überschuß auf die Mitoseaktivität ist in Abb. 9 veranschaulicht. Während der ersten 5 Stunden ist der Prozentsatz der sich teilenden Zellen in den Kontrollkulturen höher als bei den mit Thymidin behandelten Kulturen. Dann aber kommt es bei den Zusatzkulturen zu einem rapiden Anstieg der mittleren Mitoserate, wie auch der Einzelwerte (Tab. 1), der bei 10 bzw. 12 Stunden ein Maximum aufweist. In der Erythropoese ist der mittlere rote Mitoseindex in den Zusatzkulturen auch noch bei 24, 48 und 72 Stunden etwas erhöht.

Mittelwertkurve aus den Reifungskurven der Versuche II bis V

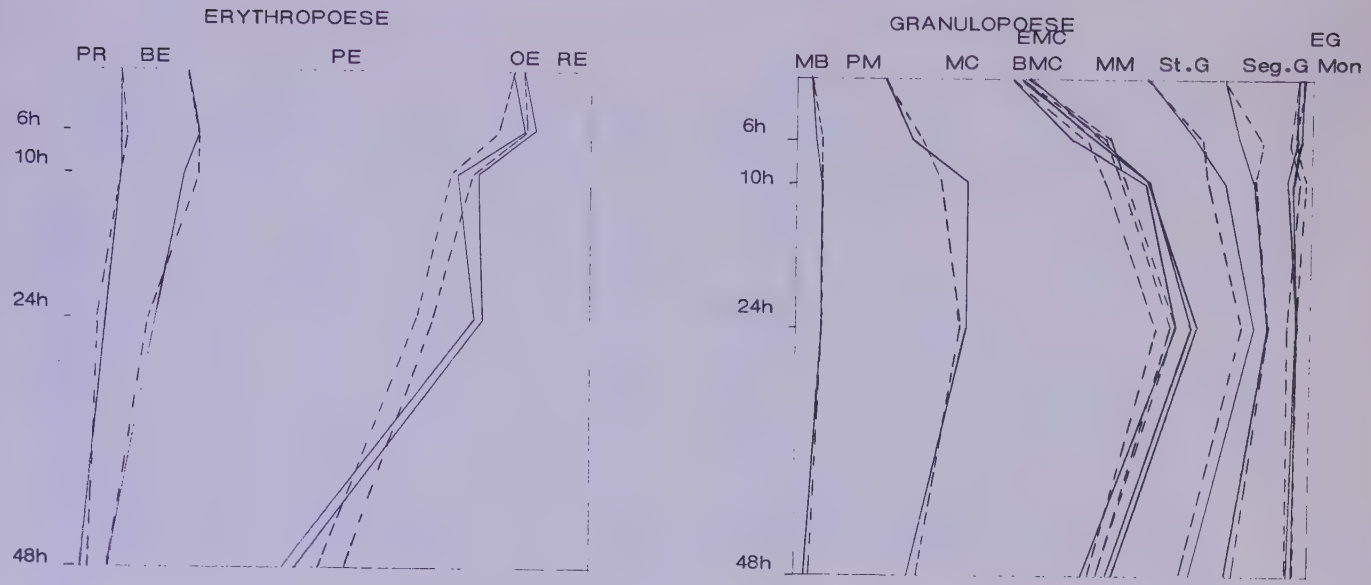


Abbildung 8

Versuch II bis V

Abbildung 9

Mittelwerte der Mitoseindices

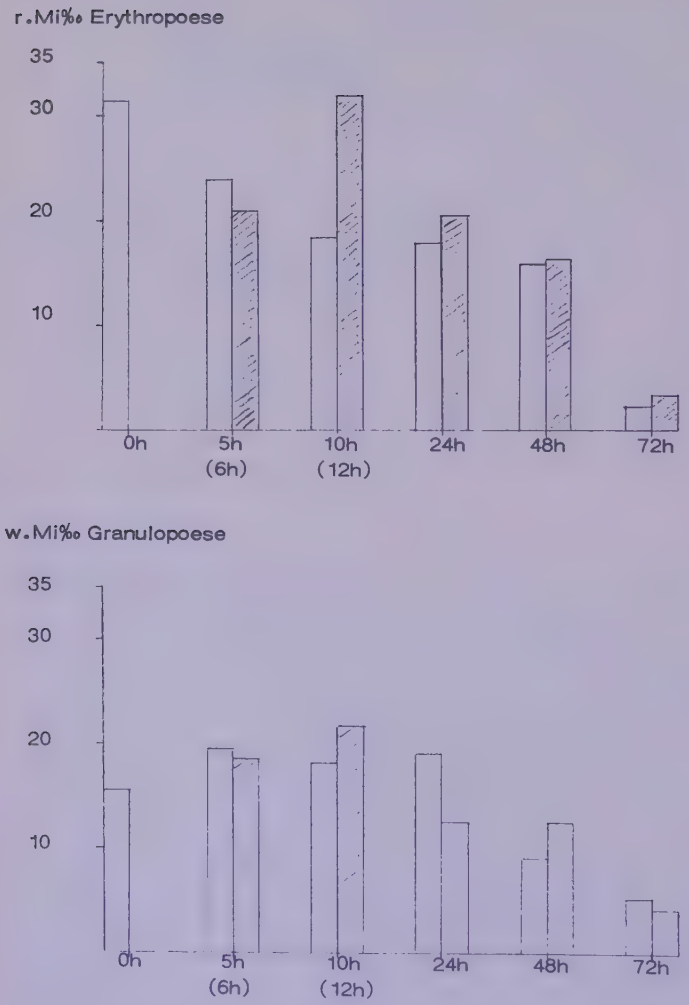


Tabelle 1

ÜBERSICHT ÜBER MITOSEN, ZAHL DER TEILUNGSFÄHIGEN ZELLEN UND MITOSEINDICES DER

ERYTHROPOESE

	Versuch	I	II	III	IV	V	mittl.r.Mi ‰ (Versuch II bis V)
Original	Mitosen	2	4	7	10	20	
	teilf.Z.	498	563	478	180	408	
	Mi ‰	4,0	7,1	14,5	55,0	49,0	31,4
5h/6h K	Mitosen		8	6	12	19	
	teilf.Z.		654	408	406	486	
	Mi ‰		12,2	14,7	29,8	39,2	23,9
5h/6h Z	Mitosen		9	10	10	20	
	teilf.Z.		730	688	362	678	
	Mi ‰		12,3	14,5	27,6	29,5	21,0
10h/12h K	Mitosen		7	5	12	20	
	teilf.Z.		610	444	444	830	
	Mi ‰		11,5	11,2	27,0	24,1	18,4
10h/12h Z	Mitosen		14	8	22	30	
	teilf.Z.		747	410	464	702	
	Mi ‰		18,7	19,4	47,5	43,0	32,1
24h K	Mitosen	1	4	10	10	18	
	teilf.Z.	465	447	662	470	692	
	Mi ‰	2,1	8,95	15,1	21,3	26,0	17,8
24h Z	Mitosen	2	3	7	10	24	
	teilf.Z.	375	410	434	416	688	
	Mi ‰	5,33	7,3	16,1	24,0	35,0	20,6
48h K	Mitosen	1	2	1	6	15	
	teilf.Z.	438	416	90	198	494	
	Mi ‰	2,28	4,8	11,1	30,3	30,1	15,7
48h Z	Mitosen	1	2	1	8	13	
	teilf.Z.	425	302	120	210	490	
	Mi ‰	2,35	6,6	8,3	38,0	26,5	16,3
72h K	Mitosen	0	1				
	teilf.Z.	386	456				
	Mi ‰	0	2,2				2,2
72h Z	Mitosen	0	1				
	teilf.Z.	364	299				
	Mi ‰	0	3,35				3,35

K = Kontrollkulturen Z = Zusatzkulturen / = beziehungsweise

Granulopoese:

In der Granulopoese brachte die Inkubation mit Thymidin für die Reifung (Abb. 8) eine geringe Linksverschiebung nach 10 bis 24 Stunden, für die Regeneration (Abb. 9, Tab. 2) auch kaum auffällige Unterschiede.

Die Mittelwertkurve der G/E Indices (Abb. 10, Tab. 3) weist bei 10 Stunden einen bis auf 48 Stunden erniedrigten Wert aus.

Die karyologischen Kurven (Abb. 11) zeigen einen fast kongruenten Verlauf an.

Tabelle 2

ÜBERSICHT ÜBER MITOSEN, ZAHL DER TEILUNGSFÄHIGEN ZELLEN UND MITOSEINDICES DER

GRANULOPOESE

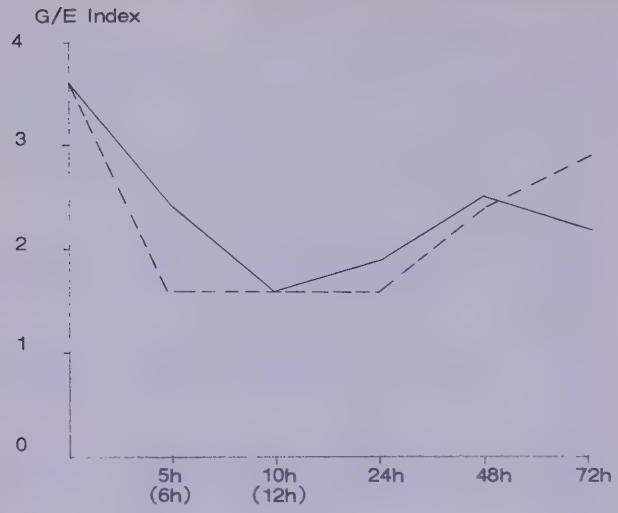
	Versuch	I	II	III	IV	V	mittl.w.Mi ‰ (Versuch II bis V)
Original	Mitosen	6	9	8	21	18	
	teilf.Z.	760	948	1116	902	838	
	Mi ‰	7,9	9,5	7,15	23,3	21,5	15,4
5h/6h K	Mitosen		12	10	24	20	
	teilf.Z.		926	882	982	676	
	Mi ‰		13,0	11,3	24,3	29,7	19,6
5h/6h Z	Mitosen		12	8	20	20	
	teilf.Z.		977	906	858	682	
	Mi ‰		12,3	8,85	23,3	29,4	18,5
10h/12h K	Mitosen		15	8	17	20	
	teilf.Z.		1034	912	1056	616	
	Mi ‰		14,5	8,7	16,0	32,4	17,9
10h/12h Z	Mitosen		16	10	22	25	
	teilf.Z.		932	976	970	695	
	Mi ‰		17,2	10,25	22,7	36,0	21,5
24h K	Mitosen	6	11	8	21	20	
	teilf.Z.	906	1036	862	890	616	
	Mi ‰	6,6	10,6	9,3	23,6	32,4	19,0
24h Z	Mitosen	5	9	5	20	15	
	teilf.Z.	847	1119	833	988	615	
	Mi ‰	5,9	8,0	6,0	20,2	24,4	12,8
48h K	Mitosen	6	8	11	7	8	
	teilf.Z.	823	992	1198	954	644	
	Mi ‰	7,25	8,0	9,2	7,35	12,4	9,2
48h Z	Mitosen	4	10	11	8	15	
	teilf.Z.	682	1114	1180	832	646	
	Mi ‰	5,9	9,0	9,3	9,6	23,2	12,6
72h K	Mitosen	5	6				
	teilf.Z.	698	1140				
	Mi ‰	7,15	5,25				5,2
72h Z	Mitosen	5	4				
	teilf.Z.	884	1402				
	Mi ‰	5,65	2,86				4,2

K = Kontrollkulturen Z = Zusatzkulturen / = beziehungsweise

Versuch II bis V

Abbildung 10

Mittelwertkurve der G/E Indices



——— = Kontrollkulturen

- - - - - - - - = Zusatzkulturen

Tabelle 3

ÜBERSICHT ÜBER DIE G/E INDICES

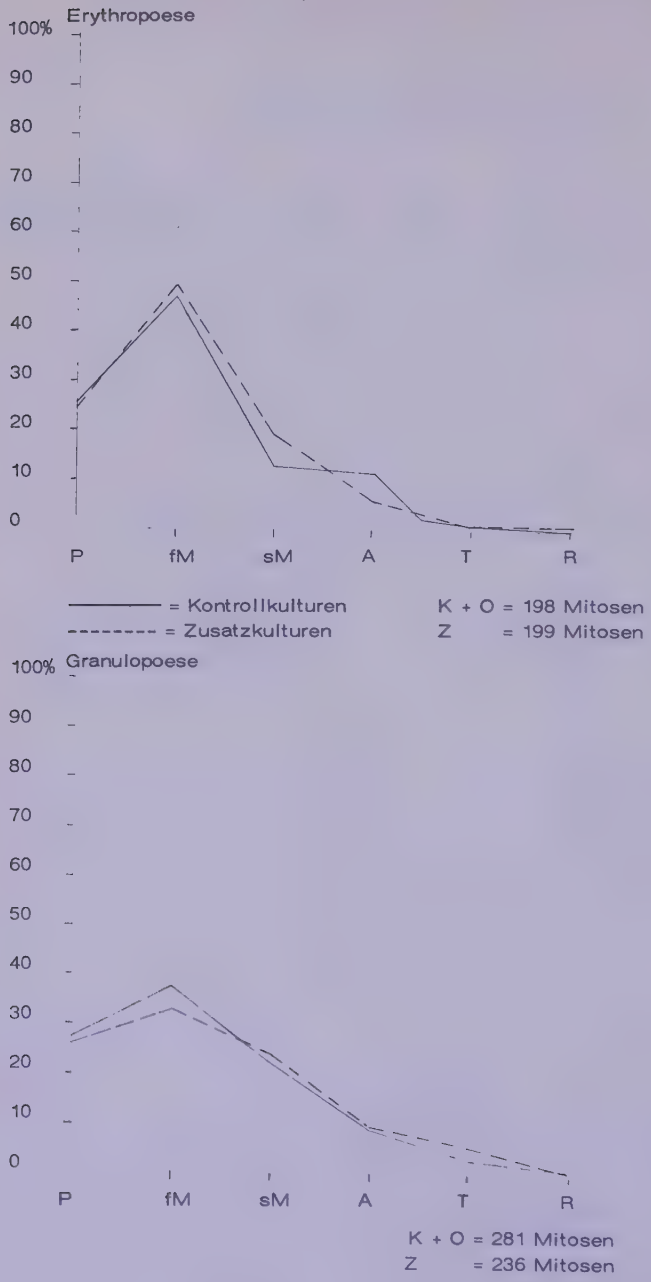
Versuch	I	II	III	IV	V	mittl.G/E Index (Versuch II bis V)
Original	2,08	2,2	3,14	6,3	2,6	3,6
5h/6h K		1,86	3,5	2,48	1,85	2,4
5h/6h Z		1,24	1,25	2,6	1,47	1,6
10h/12h K		1,46	1,98	2,2	0,71	1,6
10h/12h Z		1,1	1,54	2,13	1,58	1,6
24h K	1,75	2,2	1,02	1,91	0,93	1,9
24h Z	1,47	1,82	1,42	2,2	0,97	1,6
48h K	1,4	1,49	4,84	2,2	1,36	2,5
48h Z	1,2	2,1	3,9	2,35	1,28	2,4
72h K	1,37	2,2				2,2
72h Z	1,65	2,9				

K = Kontrollkulturen

Z = Zusatzkulturen

/ = beziehungsweise

Karyologische Kurve



Beurteilung der Ergebnisse und Diskussion

Aus in vitro Untersuchungen ist hinreichend bekannt, daß nach Zusatz von Thymidin zu Bakterienkulturen (2, 9) oder zu Zellkulturen (5, 10, 11, 23, 24, 32, 33, 34, 35) eine Hemmung der DNS-Synthese erfolgen kann, welche nach Entfernung des Thymidins aus dem Nährmedium von einer Mitosewelle abgelöst wird. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten der Versuchsgestaltung:

Bootsma et al. behandelten für 24 Stunden menschliche Nierenzellen einmal mit 2 mM Thymidin, wuschen die Substanz dann aus und schlossen nach etwa 15 Stunden eine zweite gleiche Behandlung mit Thymidin im Überschuß an.

Studzinsky und Lambert behandelten schon synchronisierte Hela-Zellkulturen mit Thymidin im Überschuß, um den Effekt des "unbalanced growth" (Barner und Cohen) zu vermeiden. Unter diesem Begriff wird die Fortdauer der RNS- und Proteinsynthese bei Hemmung der Zellteilung und DNS-Synthese definiert, wobei es zu einer Vergrößerung des Zellvolumens kommt.

Da wir nicht die Wirkung von Thymidin auf die Mitosephasen untersuchen wollten, haben wir uns für eine einmalige Behandlung der Knochenmarkkulturen für 30 Minuten mit Thymidin (24,7 mM/l) entschieden.

Unsere Frage lautet:

Hat Thymidin einen direkten stimulierenden Effekt auf die Proliferation der humanen Erythropoese und der Granulopoese in vitro?

Unter Proliferation verstehen wir Regeneration und Reifung (3).
Die Regeneration lässt sich anhand der Mitoseindices und karyologischen Kurven, die Reifung anhand der Reifungskurven beurteilen. Um eine mögliche Proliferationsanregung durch die Anwendung des Thymidins in der oben angegebenen Weise beurteilen zu können, müssen wir die einzelnen Komponenten der Proliferation, nämlich Regeneration (I) und

Reifung (II) gesondert betrachten.

D Die karyologischen Kurven lassen eine Hemmung des Mitoseablaufs durch Thymidin ausschließen, wie sie häufig durch Spindelblocker, wie zum Beispiel Colchicin, hervorgerufen wird. Der Mitoseindex entspricht dann der Mitosehäufigkeit und ist als Maß für die Regeneration zu verwenden. Die Zellregeneration durch Mitoseaktivität wurde in unseren Versuchen gegenüber der Kontrollreihe gefördert. Für die Erythropoese lässt sich jedenfalls ein deutlicher Anstieg der mittleren Mitoserate mit einem Maximum bei 10 bis 12 Stunden und ein nicht mehr so deutlicher Anstieg bei 24 Stunden feststellen. Die Granulopoese weist keine so hohe Synchronisation auf, jedoch ist auch hier die vermehrte Mitoseaktivität bei 10 Stunden zu erkennen.

Ähnliche Ergebnisse fanden Bootsma et al. an Zellen der menschlichen Niere. Dabei fällt uns auf, daß die Mitosewelle nach Entfernen des Thymidins etwa 1 bis 3 Stunden früher erscheint, als man das bei Betrachtung der normalen Dauer der S- und G_2-Phase erwarten würde. Das wurde auch von Rao und Engelberg beschrieben.

Nach Mueller und Rueckert, die Hela-Zellen untersuchten, wird die DNS-Synthese nicht vollständig blockiert. In welcher Teilungsphase des Zellzyklus die Zellen im Hinblick auf die DNS-Synthese allerdings durch die Einwirkung von Thymidin blockiert werden, lässt sich nicht sagen. Hierzu müßten Untersuchungen mit markierten Substanzen durchgeführt werden, wie sie von Studzinsky und Lambert an Hela-Zellen gemacht worden sind. Sie konnten zeigen, daß der Block jedenfalls nicht an der G_1-S-Grenze liegt.

Nach anderen Untersuchungen von Bootsma et al. wurde nach zweimaliger Behandlung mit Thymidin ein noch deutlicheres Maximum der Mitoseaktivität schon nach 8 bis 9 Stunden beobachtet. Außerdem fanden sie an Nieren epithelien wie wir bei der Erythropoese, daß sich der Grad der Synchronisation schon nach einem Generationszyclus auffallend vermindert hatte.

Wir können also feststellen, daß eine Behandlung der Knochenmarkkulturen mit Thymidin (24,7 mM/l) in der oben angegebenen Weise wie bei Nieren- und Hela-Zellen die DNS-Synthese hemmt, weshalb es nach Entfernung des Thymidin zu einer mäßigen Synchronisation mit einer maximalen Mitosehäufigkeit nach 10 bis 12 Stunden kommt. Dabei wird die Erythropoese stärker synchronisiert als die Granulopoese. Ein zweiter Synchronisationsgipfel wird bei der Granulopoese trotz weniger Stichpunkte bei der Untersuchung nach 48 Stunden angedeutet.

II) Welchen Effekt hat nun die Synchronisation auf die Reifung?

Die Synchronisation ist viel markanter bei der Erythropoese ohne eine Verschiebung der Reifungskurven bis zur Mitosehäufung nach 10 Stunden. Danach läuft die Reifung im teilungsfähigen Erythroblastenpool auch unverändert weiter. Nach 24 Stunden kommt es zu einer Verschiebung von polychromatischen zu reifen Erythroblasten, also zu einer Reifungsförderung im nicht mehr teilungsfähigen Erythroblastenpool. Später wird der Effekt überkompensiert, so daß die Reifung nach 48 Stunden wieder zurückbleibt. Ob es durch die Blockierung der DNS-Synthese oder durch die Vermehrung von Zellteilungen zur kurzfristigen Reifungsstimulierung kommt, lässt sich mit unserer Methode nicht entscheiden.
Der Eintritt der Reifungsförderung 14 Stunden nach der Regenerationsförderung spricht jedoch für Letzteres.

In der Granulopoese tritt die Linksverschiebung schon gleichzeitig mit der Mitosevermehrung nach 10 Stunden ein, so daß hier, wenn auch bei den geringen Unterschieden nur mit Vorbehalt, von einer Reifungsförderung bereits durch die DNS-Blockierung zu sprechen ist.

Jedenfalls tritt bei beiden hämatopoetischen Reihen durch die Anregung der Regeneration keine relative Vermehrung der teilungsfähigen Zellen bei der Differentialzählung ein. Vielmehr wird die Reifung auch positiv beeinflusst. Das spricht für die Kopplung der Kompartiment-Durchgangszeit (transit-time) an die Generationszeit.

Eine fördernde Wirkung von Thymidin im Überschuß auf die Erythroblastenentkernung hingegen konnten wir nicht feststellen, wie die kaum voneinander abweichenden Mittelwertkurven der G/E Indices zeigen.

Zusammenfassung:

Von humanem Knochenmark, das durch Sternalpunktat gewonnen wurde, wurden Kulturen angelegt und teils als Kontrolle, teils unter Behandlung mit Thymidin (24,7 mM/l) für 30 Minuten in Thymidin freiem Medium inkubiert. Die nach 5 bzw. 6, 10 bzw. 12, 48 und 72 Stunden ausgestrichenen Präparate wurden ausgezählt, wobei die einzelnen Reifungsstadien der verschiedenen Zellreihen und besonders die Mitosen und deren Phasen differenziert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabellen und Kurvendarstellungen zusammengefasst. In allen Versuchen konnte für die Erythropoese eine Vermehrung der Mitoseaktivität mit einem Maximum bei 10 bzw. 12 Stunden festgestellt werden. Durch die allerdings nur geringe Synchronisation wurde die Reifung der Erythropoese vorübergehend gefördert, das heisst, die Differentialverteilung verschob sich von den polychromatischen Erythroblasten zugunsten der reifen Erythroblasten. Die Regeneration der Granulopoese wurde gleichzeitig, aber geringfügig stimuliert. Hier trat die Reifungsförderung schon zur gleichen Zeit mit der Mitosehäufung ein und dauerte länger an, sie war jedoch nur sehr geringgradig.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Apple, M.A. Greenberg, D.M. — Inhibition of cancer growth in mice by thymidine, methionine and pyruvic, glyceric and hydroxypyruvic aldehydes. Proc.Amer.Ass.Cancer Res. 9:3 (1968)

2. Barner, H.D. Cohen, S.S. — The introduction of thymine synthesis by T 2 infection of a thymine requiring mutant of Escherichia coli. J.Bact.68:80-88 (1954)

3. Boll, I. — Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1966)

4. Boll, I. und Mersch, G. — Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17:193-214 (1968)

5. Bootsma, D. Budke, L. and Voss, O. — Studies on synchronous division of tissue culture cells initiated by excess thymidine. Exp Cell Res. 33:301-309 (1964)

6. Burkhardt, R. — Cytologie and histologie of the human bone marrow. Haemat.Bluttransfus.4:11-29 (1968)

7. Carell, A. and Ebeling, A.H. — Pure cultures of large mononuclear leukocytes. J.exp.Med. 36:365 (1922)

8. Cleaver, I.E. — Thymidin metabolism and cell cinetics North Holland Research Monograph Frontiers of Biologie Vol 6:40-100 (1967)

9. Cohen, S.S. Barner, H.G. — Studies on unbalanced growth in Escherichia coli. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash)40:885-893 (1954)

10. Cohen, L.S. Studzinsky, G.P. Correlation between cell enlargement and nucleic acid and protein content of Hela cells in unbalanced growth produced by inhibitors of DNA synthesis. J.cell.comp.Physiol. 69:331-340 (1967)

11. Djordjevic, B. Kim, J.H. Modification of radiation response in synchronized HeLa cells by metabolic inhibitors, effects of DNA protein synthesis. Radiat.Res.87:435-450 (1969)

12. Eidinoff, M.L. and Rich,M.A. Growth inhibition of human tumor cellstrain by 5-fluordeoxyuridine: Time parameter for subsequent reversal by thymidine. Cancer Res. 19:521-524 (1959)

13. Galavesi, G. and Bootsma,D. Synchronisation of mamalien cells in vitro by inhibition of the DNA synthesis II Population dynamiks.Exptl.Cell Res.41:438-451 (1966)

14. Heckner,F. Leitfaden der Blutzellkunde Verlag Urbahn und Schwarzenberg München und Berlin (1965)

15. Hausmann,K. Reisner, E.H. and West, R. Thymidin as a growth factor. Anual review of biochemistry. 19:353-354 (1950)

16. Karlson, P. Lehrbuch der Biochemie 62:100-105 Thieme-Verlag (1962)

17. Kim, I,H. Kim,S.H. and Eidinoff,M.L. Cell viability and nucleic acid metabolism after exposure of Hela cells to excess thymidin and deoxyadenosine. Biochem.Pharmacol. 14:1821-1829 (1965)

18. Lajtha, L.G. The Culture of bone-marrow Cells in vitro. Britisch Medical Bulletin.Vol.15:47-49 (1959)

19. Littelfield, J.W. DNA-synthesis in partially synchronized L-cells Expt. Cell Res.26:318-326 (1962)

20. Morris, N.R. Reichard,P. and Fischer, G.A. Studies concerning the inhibition of cellular reproduktion by deoxyribonucleosides II. Inhibition of the synthesis of deoxycytidine by thymidine, deoxyadenosine and deoxyguanosine. Biochem.Biophys.Acta. 68:93-99 (1963)

21. Morris, N.R. and Fischer, G.A. Studies concerning the inhibition of cellular reproduction of deoxyribonucleosides I. Inhibition of the synthesis of deoxytidine by a phosphorylated derivat of thymine Biochem.Biophys.68:84-92 (1963)

22. Oswald, H. Synergismus der chemotherapeutischen Wirkung einer Kombination von Thymidin und Endoxan beim Ehrlich-Ascides Tumor Z.Krebsforsch. 74:376-382 (1970) Springer Verlag

23. Petersen, D.F. and Anderson, E.C. Quantity production of synchronized mammalian cells in suspension culture. Nature 203:622-643 (1964)

24. Puck, T.T. Phasing, mitotic delay and chromosomal aberrations in mammalian cells. Science, 144:565-566 (1964a) --- Studies of the life cycle of mammalian cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol 29:167-176 (1964b)

25. Rajewsky, M.F. Hülser, D.F. und Fabricius, E. Untersuchung zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen. Z. Krebs-forsch.76:266-292 by Springer-Verlag (1971)

26. Rao, P.N. and Engelberg, J. — Effects of temperature on the mitotic cycle of normal and synchronized mammalian cells. In: Cell Synchrony. I.L.Cameron and G.M. Padilla, eds. Acad. Press. N.Y. 332-352 (1966)

27. Rapoport, S.M. — Medizinische Biochemie 2. Auflage VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin (1964)

28. Rohr, K. — Das menschliche Knochenmark Verlag Gustav Thieme Stuttgart (1960)

29. Rueckert, R.R. and Mueller, G.C. — Studies on unbalanced growth in tissue culture I. Induction and consequences of thymidine deficiency. Cancer Res 20:1584-1591 (1960)

30. Schindler, R. Odartchenko, N. Grieder, A. and Ramseier, L. — Studies on the division cycle of mammalien cells Exptl. Cell Res 51:1-11 (1968)

31. Simon, E.H. and Tessman, I. — Thymidine-requiring mutants of phage T4 Proc. Natl. Acad. Sci. 50:526-532 (1963)

32. Studzinsky, G.P. and Lambert, W.C. — Thymidine as a synchronizing agent I. Nucleic acid and protein formation in synchronous Hela cultures treated with excess thymidine. J. Cell. Physiol 73:109-118 (1969)

33. Studzinsky, G.P. Cohen, L.S. — Mitomycin C induced insreases in the activities of the deoxyribonucleases of Hela cells. Biochem. biophys. Res. Commun. 23:506-512 (1966)

34. Studzinsky, G.P. Roseman, J. Schweitzer, J.L. — Elevation of deoxyribonuclease activities in HeLa cells treated with selective inhibitors of DNA synthesis. Biochem. biophys. Res. Commun. 25:313-319 (1966)

35. Xeros, N. — Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. Nature 194:682-683 (1962

Lebenslauf

Am 12. Mai 1943 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Erich Willenbrink und seiner Ehefrau Katharina, geb. Bruckschen, in Rheine geboren.

Ab 1949 Schul- und Gymnasialbesuch in Ibbenbühren, Gaesdonck und Münster. Mittlere Reife 1961. Von 1961 bis 1965 freiwilliger Soldat bei der Bundeswehr. 1966 Externenabitur beim Senator für Schulwesen in Berlin. 1967 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Freien Universität in Berlin. Physikum 1970, am 3. Juli 1973 Staatsexamen.

Ich bin verheiratet und Vater eines Kindes.